

PCT/KR 02/02154

RO/KR 20.11.2002

Rec'd PCT/PTO 30 JUN 2004

10/500447

REC'D 17 DEC 2002

WIPO PCT

대한민국 특허청

KOREAN INTELLECTUAL
PROPERTY OFFICE

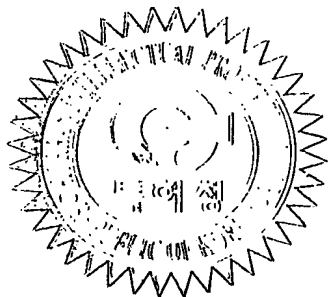
별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원번호 : 10-2001-0071712
Application Number PATENT-2001-0071712

출원년월일 : 2001년 11월 19일
Date of Application NOV 19, 2001

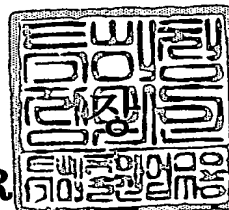
출원인 : 박희성
Applicant(s) PARK, HEE SUNG



2002 년 11 월 15 일

특허청

COMMISSIONER



PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

【서류명】 특허출원서
【권리구분】 특허
【수신처】 특허청장
【제출일자】 2001.11.19
【발명의 명칭】 식물화분을 이용한 재조합 단백질의 생산방법
【발명의 영문명칭】 Method for producing a recombinant protein using pollen
【출원인】
【성명】 박희성
【출원인코드】 4-2001-043916-8
【대리인】
【성명】 이덕록
【대리인코드】 9-1998-000461-7
【포괄위임등록번호】 2001-063114-1
【발명자】
【성명】 박희성
【출원인코드】 4-2001-043916-8
【심사청구】 청구
【핵산염기 및 아미노산 서열목록】
【서열개수】 3
【서열목록의 전자파일】 첨부
【취지】 특허법 제42조의 규정에 의하여 위와 같이 출원합니다. 대리인 이덕록 (인)
【수수료】
【기본출원료】 20 면 29,000 원
【가산출원료】 3 면 3,000 원
【우선권주장료】 0 건 0 원
【심사청구료】 5 항 269,000 원
【합계】 301,000 원
【감면사유】 개인 (70%감면)
【감면후 수수료】 90,300 원

【요약서】

【요약】

본 발명은 식물화분을 이용한 재조합 단백질의 생산방법에 관한 것으로, 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)와 진공침윤(Vacuum infiltration)을 이용하여 식물의 화분(pollen)에 재조합 유전자를 도입하고 화분신장(pollen tube growth)을 유도한 후 이로부터 재조합 단백질을 생산하는 방법으로서 저비용으로 초단기에 대량의 재조합 단백질을 생산하는 효과가 있다.

【대표도】

도 1

【색인어】

화분, 재조합 단백질, 항궤양백신, 아그로박테리움 튜머파시엔스, UreB유전자

【명세서】**【발명의 명칭】**

식물화분을 이용한 재조합 단백질의 생산방법{Method for producing a recombinant protein using pollen}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 백합화분관이 신장하는 것을 나타낸 현미경 사진이며,
도 2는 GUS리포터유전자를 지닌 pBI121과 ureB유전자를 지닌 pBIUreB의 지도이고,
도 3은 PCR에 의한 화분에서의 ureB유전자도입의 확인한 결과이고,
도 4는 GUS리포터유전자의 화분발현모습을 나타내는 현미경 사진이며,
도 5는 화분에서의 ureB mRNA발현모습을 나타낸 사진이고,
도 6은 화분에서의 UreB 단백질의 발현을 확인한 결과이다.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

<7> 본 발명은 재조합 단백질의 생산을 위하여 식물의 화분을 생산숙주로이용하는 것에 관한 것이다. 식물을 이용하여 재조합 단백질의 생산을 시도하는 경우 식물체, 식물기관 또는 식물배양세포를 이용하여 세포 내 축적 (세포질 또는 세포내 소기관), 특이조직이나 기관(종자, 피경 등) 또는 분비 시스템(세포간극, 배지분비 등)을 통한 생산연구가

많이 이루어지고 있다(Molony, Biotechnol. Eng., 9, 3, 1995; Kusnadi et al., Biotechnol. Bioeng., 56, 473, 1997; Smith & Glick, Biotechnol. Adv., 18, 85, 2000; Sijmons et al., Bio/Technology, 8, 217, 1990; Doran, Curr. Opin. Biotechnol., 11, 199, 2000; Boothe et al., Drug Develop. Res., 42, 171, 1997; Giddings et al., Nature Biotechnol., 18, 1151, 2000). 동물세포, 박테리아 등의 기타 생산숙주를 이용하는 경우보다 식물을 이용한 재조합 단백질의 생산은 그 장점으로서 재배 및 유지비용이 적게 소요되고 생산확대를 위한 시간 및 비용 면에서 훨씬 경제적이다. 분자수준에서는 당화(glycosylation)나 폴딩(folding)이 사람의 경우와 유사하다는 것, 또한 형질전환동물이나 박테리아에서의 생산정제, 단백질에서와 같은 인체 병원성 물질의 오염이 없다는 것 등이다. 형질전환 식물세포변이주를 이용하여 재조합 단백질을 생산할 경우, 생물반응기(bioreactor)를 사용하여 단기간에 소량의 고가 단백질생산을 목표로 하는데 이 때, 안정된 단백질생산용 식물세포주의 유지 및 세포증식을 위한 생물반응기의 가동을 위하여 철저한 관리 및 분석기술이 필요하다.

- <8> 종래 식물화분을 이용한 발명으로는, 미국특허문헌 5,929,300에 형질전환 식물체를 생산하는 방법으로, 아그로박테리움을 이용하여 식물화분에 유전자를 도입하고 이를 암술에 수정시켜 종자를 얻은 다음 이를 발아시켜 형질전환식물체를 제작하는 방법에 관하여 공지되어 있다. 그러나 목적하는 유전자를 발현시키기까지 형질전환시킨 후 자식(inbreeding)하여 종자를 얻어야 하므로 긴 시간이 소요되고, 과정이 복잡하며, 담배, 목화과 같은 일년생 식물의 화분에만 적용할 수 있고, 수목의 화분(소나무, 은행나무 등)에는 이용할 수 없는 단점이 있다.

- <9> 본 발명자는 상기와 같은 단점을 극복하고자 연구하던 중, 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)와 진공침윤(Vacuum infiltration)방법을 이용하여 식물의 화분(pollen)에 재조합 유전자를 도입하고 화분신장(pollen tube growth)을 유도하면 짧은 시간 내에 재조합 단백질을 대량생산할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- <10> 식물의 화분은 식물세포주와 같이 재조합 단백질생산을 위한 숙주로서 이용하는 경우는 없었으나 재조합 단백질의 생산을 위하여 화분을 이용하려는 경우 다음과 같은 장점을 기대할 수 있다. 즉, 1)화분세포를 저렴한 비용으로 풍부하게 수집하여 생산숙주로 직접 이용할 수 있음으로써 세포주를 이용한 생산시스템에 비하여 세포증식, 세포의 유전적 안정성의 유지, 생물반응기의 가동에 소요되는 복합적인 비용을 고려할 필요가 없을 것이며 2)파티클 붐바드먼트(particle bombardment), 진공침윤(vacuum infiltration), 일렉트로포레이션(electroporation) 등을 이용한 유전자도입이 용이하게 이루어질 수 있고(Tjokrokusumo et al., Plant Cell reports, 19, 792, 2000; Fernando et al., Plant Cell reports, 19, 224, 2000) 3)당을 포함한 3-4 종류의 화학물질이 첨가된 단순한 액체배지에서 수 시간에서 최대 수 일 정도의 화분배양을 거쳐 이로부터 단백질생산을 직접 시도할 수 있고 4)화분의 특성상 다양한 종류의 단백질을 분비함으로써 이들의 분비시그널을 이용하는 경우 재조합 단백질을 단순배지에서도 수확할 수 있음으로써 화분은 시간과 경제성에서 매우 우수한 단백질생산 숙주이다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

<11> 본 발명자는 재조합 단백질의 생산을 저가로 단기간에 성취할 수 있는 생산숙주로서의 식물화분의 장점을 인식하여 유전자도입 및 발현에 따른 본 발명을 완성하게 되었다. 따라서, 본 발명의 목적은 시험용, 진단용, 예방 및 치료용, 산업용 등 다양한 종류와 용도의 재조합 단백질 생산을 위한 숙주로서 특히, 식물화분을 이용하는 것을 제공하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

<12> 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 식물화분수집 및 배양, 진공침윤에 의한 화분의 유전자도입, 그리고 발아된 화분에서의 재조합 단백질의 발현·확인하는 단계로 구성된다.

<13> 제 1단계 : 식물화분의 배양

<14> 백합(*Lilium longiflorum*)의 꽃이나 소나무로부터 떼어낸 수술에서 화분을 수집하여 -70°C에 보관하여 사용한다. 0.5~5 gram의 화분을 200 ml의 화분발아배지에 섞어 25~30°C에서 2~6시간 암소에서 배양한 후 이를 진공침윤에 의한 유전자도입에 사용한다.

<15> 본 발명에서 사용하는 식물화분은 백합, 목화, 담배와 같은 일년생 식물의 화분뿐만 아니라 소나무과(*Pinaceae*), 은행나무과(*Ginkgoaceae*)에 속하는 수목의 화분 등 모든 종류의 식물화분의 사용이 가능하며, 특정한 식물의 화분에 한정되지 않는다.

- <16> 본 발명의 화분배양배지는 5~10% sucrose, 0.5~3 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 50~300 μM boric acid, 0.001~5 mM KNO_3 , 0.1~10 mM KH_2PO_4 가 되게 사용하는 것이 바람직하고, 더욱 바람직하게는 7% sucrose, 1.27 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 162 μM boric acid, 0.99 mM KNO_3 , 3 mM KH_2PO_4 가 되게 사용한다.
- <17> 제 2단계: 재조합 플라스미드 구축
- <18> 표적유전자를 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 벡터계에 삽입하여 재조합 플라스미드를 구축한다.
- <19> 본 발명에서는 화분도입유전자로서 GUS리포터유전자를 지닌 pBI121(도 1)과 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*)의 ureB 유전자를 재조합한 pBIUreB(도 2)를 구축하여 재조합 단백질을 생산하는데 이용하였으나, 본 발명의 방법에 의해 생산할 수 있는 재조합 단백질은 ureB 단백질 외에 식물화분으로부터 생산될 수 있는 어떠한 단백질도 포함한다.
- <20> 제 3단계: 아그로박테리움 형질전환:
- <21> 상기 제 2단계에서 구축한 재조합플라스미드 DNA는 동결 및 해빙방법(freeze-thaw)으로 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*)에 도입 후 카나마이신 포함 LB배지에서 선발하여 배양한 후 진공침윤에 사용한다.
- <22> 제 4단계: 진공침윤에 의한 유전자도입:

<23> 본 발명에서 아그로박테리움을 이용하여 식물화분에 유전자를 도입하는 것은 파티클 봄바드먼트(particle bombardment), 진공침윤(vacuum infiltration), 일렉트로포레이션(electroporation) 등의 방법을 사용할 수 있다.

<24> 제 5단계: 유전자도입 및 유전자 발현의 확인

<25> 진공침윤에 의하여 재조합유전자를 도입 후 발아시킨 화분을 수집하여 이로부터 CTAB방법(Draper J. et al., Plant genetic transformation and gene expression: A laboratory manual, p204-208, Blackwell Scientific Publication, 1988)으로 염색체 DNA를 추출한 후 이를 PCR에 의하여 유전자도입여부를 확인할 수 있으며, 노던 블롯과 웨스턴 블롯등의 일반적인 분자생물학적 방법에 의해 유전자의 발현을 확인할 수 있다.

<26> 본 발명은 식물화분에 유전자 도입과정과 10시간 내지 7일 화분배양하여 재조합 단백질의 생산함을 그 특징으로 한다.

<27> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

<28> 실시예 1: 백합화분의 배양

<29> 백합(*Lilium longiflorum*)의 꽃에서 떼어낸 수술로부터 화분을 수집하였으며 사용할 때까지 -70°C 에 보관하였다. 1 gram의 백합화분을 200 ml의 화분발아배지(7% sucrose, 1.27 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 162 μM boric acid, 0.99 mM KNO_3 , 3 mM KH_2PO_4)에 섞어 27°C 에서 3

시간 암소에서 배양한 후 이를 진공침윤에 의한 유전자도입에 사용하였다. 도 1은 백합 화분이 시간에 따라 발아배지에서 신장하는 모습을 보여주는 것이다.

<30> 실시예 2 : 재조합플라스미드의 구축

<31> 화분에서의 유전자발현을 관찰하기 위하여 두 종류의 재조합 플라스미드를 준비하였다. 그 중 하나는 GUS리포터유전자를 지닌 pBI121(Clontech사 제품)이며 다른 하나는 헬리코박터 파일로리의 ureB유전자(Genbank accession number AF352376; 서열3)를 지니는 pBIUreB로서, 재조합UreB단백질은 항궤양백신으로서 효과가 있음이 보고되었다. pBIUreB의 제작과정은 하기와 같다.

<32> 프라이머 1: 5'-ATC CTA GAA TGA AAA AGA TTA GCA-3'(서열 1)

<33> 프라이머 2: 5'-GAG CTC CTA GAA AAT GCT AAA GAG-3'(서열 2)를 합성하고, 헬리코박터 파일로리의 유리아이즈(urease) 유전자군을 지니는 pH808(Lee et al., J. Biochem. Mol. Biol. 31, 240, 1998) 플라스미드를 분양받아 PCR을 수행하고 1.7 Kb의 ureB DNA 절편(서열 3)을 생산하였다. 이는 pT7 Blue T-vector(Novagen사 제품)에 접합하여 pTUreB를 제조하였다. pTUreB를 XbaI과 SacI으로 절단하여 얻은 1.7 Kb ureB DNA는 pBI121을 XbaI과 SacI으로 절단하여 GUS 리포터유전자를 제거한 위치에 대체 삽입하였다. 이로써 pBIUreB를 제조하였으며, 이의 재조합 모식도를 도 2에 표시하였다.

<34> 실시예 3: 아그로박테리움 형질전환 및 진공침윤에 의한 유전자도입

<35> 상기 실시예 2의 pBI121과 재조합 플라스미드인 pBIUreB를 동결 및 해빙방법

(freeze-thaw)으로 아그로박테리움 튜머파시엔스 A136(*Agrobacterium tumefaciens* A136 ; ATCC 51350) 에 각각 도입 후 카나마이신 포함 LB배지에서 선발하여 배양한 후 진공침윤에 사용하였다.

<36> 유전자도입을 위하여 pBI121 및 pBIUreB로 각각 형질전환시킨 아그로박테리움 튜머파시엔스와 실시예 1에서 3 시간 미리 배양한 화분을 섞어 진공침윤을 실시하였다. 즉, 카나마이신과 스트렙토마이신이 각각 50 mg/L가 첨가된 LB 액체배지에서 아그로박테리움을 배양하고 배양액 1 ml을 원심분리(10,000g, 3 min)하여 수집된 균체를 백합화분이 포함되어있는 배양액(화분 50 mg/1 ml 화분발아배지)으로 균일하게 섞었다. 이를 진공장치에 옮겨 진공(-80 Pa, 20 min)을 가한 후 화분을 여과지에 걸러서 세포텍심(cefotaxime) 200 mg/1가 포함된 화분배양액으로 2 번의 세척을 실시하였다. 수집한 화분은 10 ml의 화분배양액으로 옮긴 후 27°C에서 20시간 발아시켰다.

<37> 실시예 4: 유전자도입 확인

<38> 상기 실시예3에서 화분배양하여 신장된 화분을 수집하였다. 유전자도입의 확인을 위하여 화분에서 유전체 DNA를 분리하고 이를 주형 DNA로 이용하여 PCR을 실시하였다. PCR은 94°C 40초, 65°C 1분 30초, 72°C 2분의 사이클을 35회 실시하였으며 프라이머는 ureB DNA의 확인을 위하여 서열 1과 서열 2의 프라이머를 사용하였다. DNA 합성결과는 1% 아가로즈 전기영동에 의하여 확인하였다. 도 3에서 형질전환된 백합화분의 DNA에서는 pBIUreB 도입의 경우 1.7 Kb의 DNA단편이 합성되는 것을 확인하였으며 비형질전환 화분, pBI121형질전환화분에서는 나타나지 않았다.

<39> 실시예 5 : 화분에서의 GUS의 발현

<40> 진공침윤에 의하여 형질전환 시킨 화분이 신장한 후 도입유전자의 발현을 확인하기 위하여 pBI121의 경우 이로부터 발현되는 베타-글루크로니데이즈(β -glucuronidase)의 활성을 기질인 X-gluc과의 반응에 의한 푸른색 생성을 현미경으로 관찰하는 히스토케미스트리에 의하여 확인하였다. 즉, X-gluc 용액(100 μ l 100 mM NaPO₄, 50 μ l X-gluc (1 mg/ml), 850 μ l 멸균증류수)에 신장된 화분을 섞고 3 시간 암 상태에 방치한 후 현미경으로 관찰하였으며 그 결과는 도 4에 나타나고 있다. 비형질전환 신장화분에서는 매우 약한 푸른색이 관찰되었으나 pBI121도입 화분에서는 매우 강한 푸른색이 관찰됨으로써 GUS 유전자의 발현이 이루어지는 것을 확인할 수 있었다.

<41> 실시예 6 : 노던블롯을 통한 화분에서의 UreB의 발현조사

<42> pBIUreB를 도입한 화분에서의 ureB 유전자의 발현은 노던블롯에 의한 ureB mRNA 생성에 의하여 확인하였다. 프로브의 제작은 pTUreB의 XbaI과 SacI처리에 의한 1.7 kbp DNA 절편을 준비하여 랜덤프라임드 DNA 레이블링 키트(random primed DNA labelling kit, Reche Molecular Biochemicals사 제품)의 지침에 의하여 제작하였다. 신장화분으로부터의 RNA는 guanidine isothiocyanate포함 RNA추출버퍼를 이용하여 분리하였으며 이를 1% formaldehyde 겔에서 전기영동으로 분리 후 나이트란 멤브레인(Nytran membrane, Schleicher & Schuell사 제품)으로 옮겨, 위에서 제작한 프로브와 노던블롯하였다. 노던블롯 조건은 하이브리드액(5X SSC, 0.1%의 N-라우릴사르코신, 0.02%의 SDS, 2%의 블로

킹제(blocking agent), 30%의 포름아미드)을 사용하여 42℃에서 24시간 반응시킨 후 세척(0.5 x SSC, 0.5% SDS)하여 X-ray 오토래디오그래피(autoradiography)를 행하였다. 그 결과는 도 5에서 나타나고 있으며 비형질전환 화분, 아그로박테리움을 처리한 화분, pBI121을 도입한 화분에서는 1.7 kb ureB mRNA가 나타나지 않고 있으며 pBIUreB도입화분에서만 발현된 것을 볼 수 있다.

<43> 실시예 7 : 웨스턴블롯을 통한 화분에서의 UreB 발현조사

<44> 신장화분을 미니페슬(mini pestle)로 마쇄하여 단백질을 추출하여(KPO₄ pH 7.6, 2 mM PMSF, 10 mM EDTA)로 현탁한 후, 13,000g에서 10분 간 원심분리하여 상등액을 분리하였다. Lowery법에 의하여 단백질 정량을 한 후 30 ug의 단백질을 웨스턴블롯 분석에 사용하였다. 추출단백질을 8% SDS-폴리아크릴아마이드(polyacrylamide)젤로 분리 후 전이버퍼(0.025 M Tris-HCl pH 8.3, 0.15 M glycine, 20 % SDS)에서 300 mA로 3-4 시간 하이본드-P 멤브레인(Amersham사 제품)에 단백질을 옮겨 웨스턴블롯 분석을 하였다. 일차 항체는 토끼의 anti-H. pylori urease IgG를 사용하고 2차 항체는 염소의 anti-rabbit IgG HRP-conjugate를 사용하였으며 항원 항체반응은 ECL kit(Amersham사 제품)을 사용하여 관찰하였고 그 결과는 도 6에 나타나고 있다. 콘트롤 67,000 Da. UreB단백질은 헬리코박터의 재조합 유리에이즈단백질을 사용하였으며 비교군인 비형질전환 화분, 아그로박테리움 처리화분, pBI121도입화분에서는 67,000 Da의 콘트롤 UreB단백질과 같은 위치의 단백질이 나타나지 않는 반면 pBIUreB도입 화분에서는 잘 나타나고 있는 것이 관찰됨으로써 UreB단백질의 발현이 정상적으로 이루어진 것을 알 수 있다. 한편, UreB 단백질의 생산량은 박테리아에서의 재조합 UreB단백질을 기준으로 한 웨스턴블롯의 분석에 의한 경우

용해단백질(soluble protein)의 0.05% 정도로 측정되었으며 이는 화분 1 gram으로부터 50 ug 정도의 UreB단백질이 생산되는 것으로 계산되었다.

【발명의 효과】

<45> 이상, 상기 실시예를 통하여 명백한 바와 같은, 본 발명은 재조합 단백질 생산의 숙주로서의 식물화분을 이용함으로써, 동물세포주를 이용한 생산시스템에 비하여 세포증식, 세포의 유전적 안정성의 유지, 생물반응기의 가동에 소요되는 복합적인 비용을 고려할 필요가 없이, 손쉽고 저렴하게 재조합 단백질을 생산할 수 있는 효과가 있으며, 당을 포함한 3-4 종류의 화학물질이 첨가된 단순한 액체배지에서 수 시간에서 최대 수 일 정도의 화분배양을 거쳐 이로부터 단백질생산을 할 수 있으므로 의약산업상 및 유전공학산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

- (a) 식물로부터 화분을 분리하는 단계;
- (b) 상기 화분을 화분배양배지에서 배양하는 단계;
- (c) 표적유전자를 아그로박테리움(*Agrobacterium*) 벡터계에 삽입한 후 아그로박테리움(*Agrobacterium*)에 형질전환 시키는 단계;
- (d) 상기 형질전환된 아그로박테리움(*Agrobacterium*)을 이용하여 상기 (b)단계의 배양된 식물화분에 유전자를 도입하는 단계;
- (e) 상기 유전자가 도입된 화분을 배지에서 화분배양하여 재조합 단백질을 생산하는 단계로 구성됨을 특징으로 하는 재조합 단백질의 생산방법.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 식물화분은 백합과 또는 소나무과 식물로부터 분리한 것임을 특징으로 하는 재조합 단백질의 생산방법.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 화분배양배지는 5~10% 슈크로즈(sucrose), 0.5~3 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 50~300 μM 붕산(boric acid), 0.001~5 mM KNO_3 , 0.1~10 mM KH_2PO_4 임을 특징으로 하는 재조합 단백질의 생산방법.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 상기 (d)단계의 아그로박테리움을 이용한 유전자 도입은 파티클 붐바드먼트(particle bombardment), 진공침윤(vacuum infiltration), 일렉트로포레이션(electroporation)중에서 선택된 어느 하나의 방법임을 특징으로 하는 재조합 단백질의 생산방법.

【청구항 5】

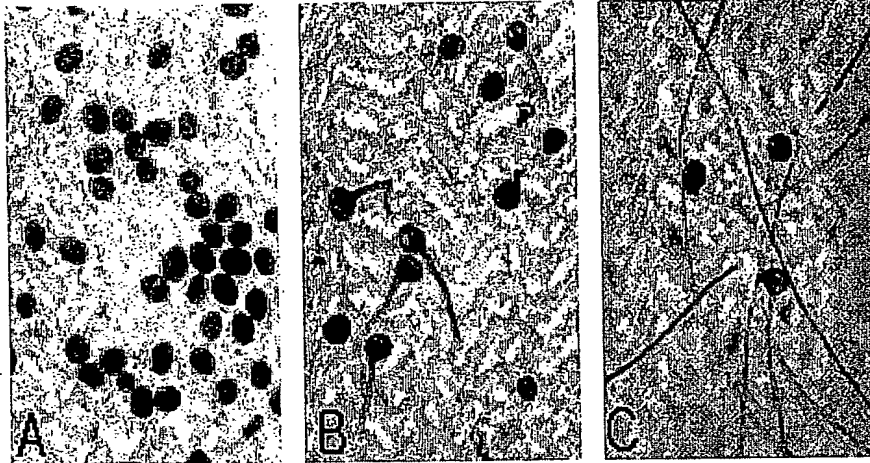
제1항에 있어서, 표적유전자는 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 유래의 UreB 유전자임을 특징으로 하는 재조합 단백질의 생산방법.

1020010071712

출력 일자: 2002/11/16

【도면】

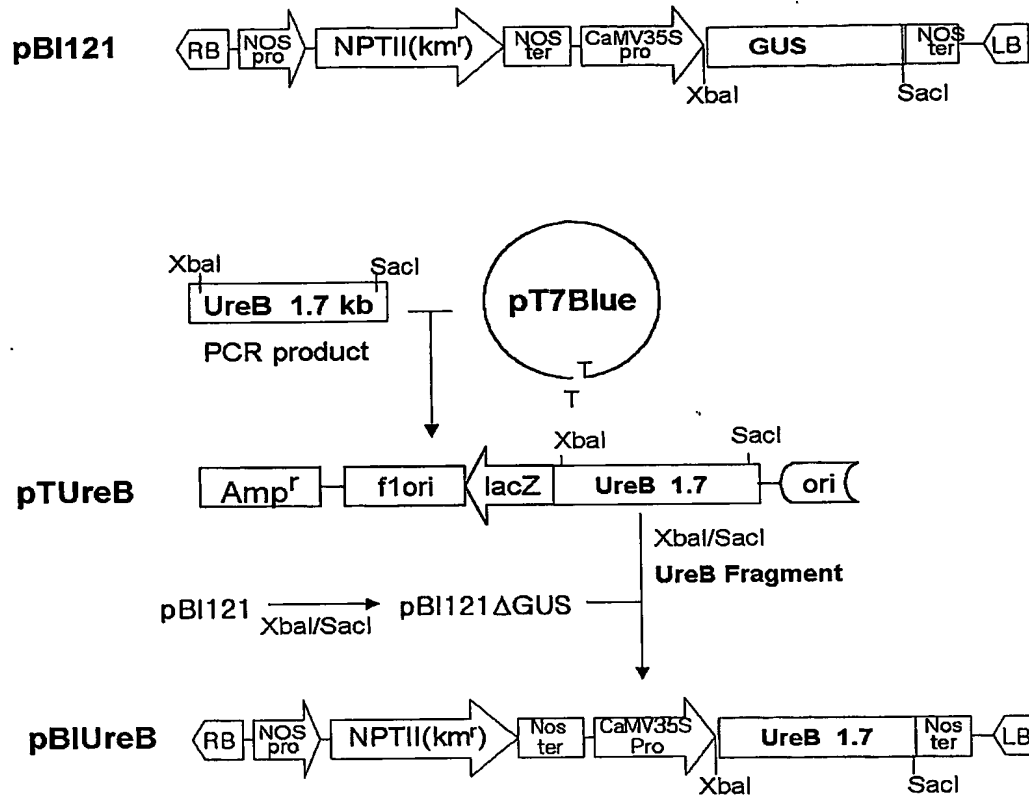
【도 1】



【보기】

백합화분이 화분발아배지에서
0시간(A), 8시간(B), 16시간(C) 경과한 후의 사진

【도 2】



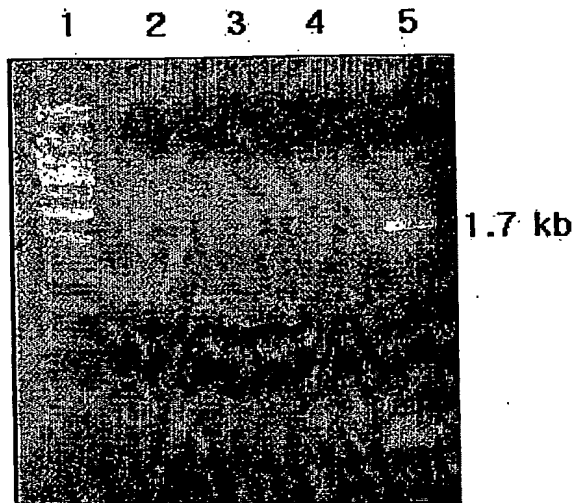
【보기】

pBI121 리포터유전자 및 pBIUreB유전자의 제작 모식도

1020010071712

출력 일자: 2002/11/16

【도 3】

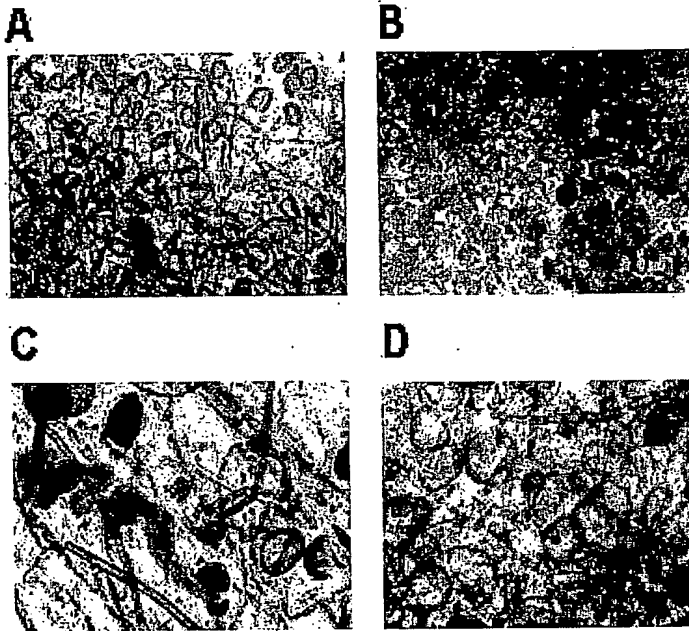


[보기]

PCR에 의한 도입 유전자 분석

1. DNA 마커
2. 비형질 전환 벡터
3. 아그로박테리움 튜메파시엔스 A136 형질 전환 화분
4. pBI121 형질 전환 화분
5. pBIUreB 형질 전환 화분

【도 4】



[보기]

GUS 리포터유전자의 히스토케미스트리에 의한 화분발현 확인

A : 비형질전환 맥합화분

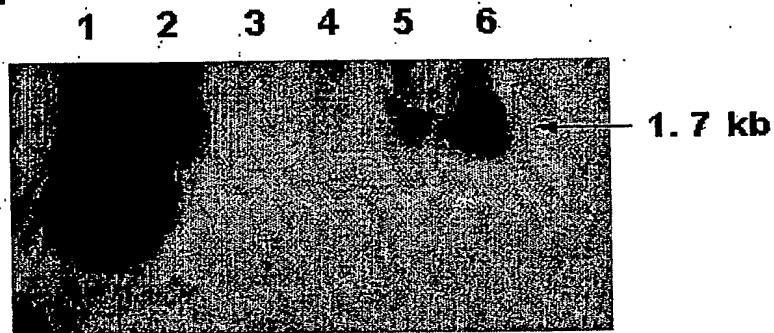
B : GUS 리포터유전자 도입화분

C, D : B의 확대모습

1020010071712

출력 일자: 2002/11/16

【도 5】



[보기]

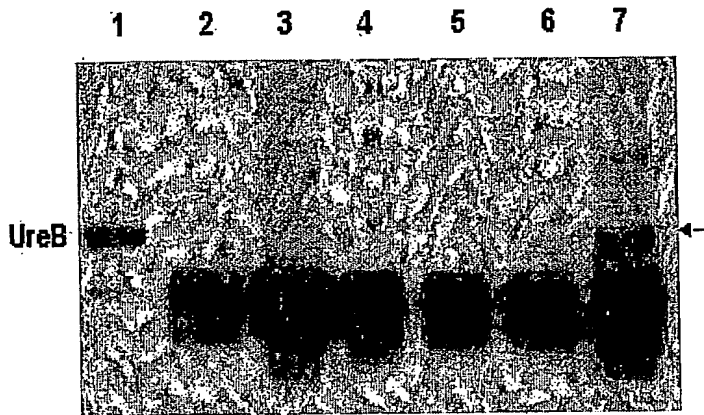
pBIUreB 형질전환화분에서의 ureB mRNA의 발현

1. RNA 마커
2. UreB DNA
3. 비형질전환 맥합화분
4. 아그로박테리움 튜메파시엔스 A136 형질전환 맥합화분
5. pBI121형질전환 맥합화분
6. pBIUreB형질전환 맥합화분

1020010071712

출력 일자: 2002/11/16

【도 6】



【보기】

화분에서의 UreB단백질의 생성

1. 헬리코박터 파일로리의 재조합 UreB단백질
2. 아그로박테리움 튜머파시엔스 A136
3. 비형질전환 백합화분
4. 아그로박테리움 튜머파시엔스 A136형질전환 백합화분
5. pBI121형질전환 백합화분
6. pBIUreB형질전환 백합화분(형질전환후 0시간 경과)
7. pBIUreB형질전환 백합화분(형질전환후 24시간 경과)

【서열목록】

<110> PARK, Hee Sung <120> Method for producing recombinant protein using
pollen <160> 3 <170> KopatentIn 1.71 <210> 1 <211> 24 <212> DNA
<213> Artificial Sequence <220> <223> oligonucleotide for amflication of
urease B gene <400> 1 atcctagaat gaaaaagatt agca
24 <210> 2 <211> 24 <212> DNA <213> Artificial Sequence <220> <223>
oliconucleotide for amplication of urease B gene <400> 2 gagctcctag aaaatgctaa
agag 24 <210> 3 <211> 1710

```

<212>    DNA <213>    Helicobacter pylori <400>
agaatatggt tctatgtatg gccctactac aggcgataaa
cttgatcgct gaagtagaac atgactacac catttatggc
tggtaaaacc ctaagagaag gcatgagcca atctaacaac
tctaatacat actaacgctt taatcgtgga ttacaccggt
tattaaagat ggcaaaatcg ctggcattgg taaaggcggt
cgtaaaaaac aatccttagcg tgggtcctgc tactgaagcc
cgtaactgct ggtgggtattg acacacacat ccacttcac
agcttttgca agcgggtgtaa caacgatgat tgggtggcgga
taacgcaacc actatcactc caggtagaag aaatttaaaa
agaatattct atgaacttaa gtttcttagc taaaggtaac
agccgatcaa attgaagccg gtgcgattgg ctttaaaatc
tccttctgca atcaatcatg cgttagatgt tgcggacaaa
ccacacagac actttgaatg aagccggttg tgtagaagac
acgcactatg cacactttcc aactgaagg cgctgggtggc
taaagtagct ggtgaacaca acattctgcc cgcttcact
tgtgaataca gaagcagaac acatggacat gcttatggtg
cattaaagaa gatgttcagt tcgctgattc aaggatccgc
agacactttg catgacatgg ggattttctc aatcaccagt
tcgtgtgggt gaagttatca ccagaacttg gcaaacagct
tggccgcttg aaagaagaaa aaggcgataa cgacaacttc
3 atgaaaaaga ttagcagaaa
60 gtgagattgg gcgatacaga
120 gaagagctta aattcggcgg
180 cctagcaaag aagaactgga
240 atttataaag cggatattgg
300 aacaaagaca tgcaagatgg
360 ttagccggtg aaggtttgat
420 tcccccaac aaatccctac
480 actggccctg ctgatggcac
540 tggatgctca gagcggcaga
600 gcttctaacg atgcaagctt
660 cacgaagact ggggcaccac
720 tacgatgtgc aagtcgctat
780 actatggcag ccattgccgg
840 ggacacgctc ctgatattat
900 aaccctaacta tccctttcac
960 tgccaccact tggataaaag
1020 cctcaaacta ttgcggctga
1080 tctgactctc aagctatggg
1140 gacaaaaaca aaaaagaatt
1200 aggatcaaac gctactgttc

```

1020010071712

출력 일자: 2002/11/16

taaatacacc attaaccag cgatcgctca tgggattagc
agtgggcaaa gtggctgact tgggtgtgtg gagtcccgca
catgatcatc aaaggcgat tcattgcatt gagtcaaag
ccctaccca caaccggttt attatagaga aatgttcgct
cgatgcaaac atcacttttg tgtctcaagc ggcttatgac
agggcttgaa aggcaagtgt tgccggtaaa aaattgcaga
gcaattcaac gacactaccg ctacattga agtcaatcct
ggatggcaaa gaagtaactt ctaaaccagc caataaagtg
cattttctag

1260 gagtatgtag gttctgtaga
1320 ttctttggcg tgaaacccaa
1380 ggtgatgcga acgcttctat
1440 catcatggta aagctaaata
1500 aaaggcatta aagaagaatt
1560 aacatcacta aaaaagacat
1620 gaaacttacc atgtgttcgt
1680 agcttggcac aactctttag
1710